

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-102251

(43)Date of publication of application : 15.04.1994

(51)Int.Cl.

G01N 27/62

H01J 49/10

(21)Application number : 04-249531

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 18.09.1992

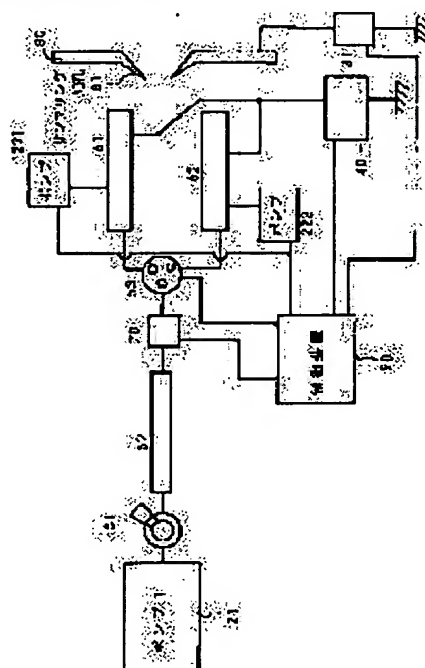
(72)Inventor : MATSUMURA KAZUMI
MIMURA TADAO
KATO YOSHIAKI

(54) MASS SPECTROMETER CONNECTED DIRECT TO LIQUID CHROMATOGRAPHY

(57)Abstract:

PURPOSE: To achieve a measurement of a sample of a mixture with an ionization thereof in different ionization polarity by the same operation by a method wherein a sample of a mixture is introduced from an injector to be separated into components with a column to check the elution thereof with a UV detector.

CONSTITUTION: A sample of a mixture is introduced from an injector 51 to be separated into components with a column 52 and the elution of the components are checked with a UV detector 70. The elution is transmitted as signal to a controller 90 and a signal for dividing components is sent to a three-way valve 53 from the controller 90. The components are divided and introduced to a positive ionization promoting ion-source section 61, and a negative ionization promoting ion-source section 62. Moreover, a voltage is applied to power sources 40 and 41 to match the ionization mode of the ion source section 61 or 62 on the side connected to a pump 221. Here, an ionization is performed in one ionization mode and subsequently, with a switching of a valve, the ionization is performed in the opposite ionization mode. Thus, the addition of an ionization promoter achieves higher sensitivity in the respective ionization modes.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 6 - 1 0 2 2 5 1

(43) 公開日 平成 6 年 (1994) 4 月 1 5 日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G01N 27/62	X	7414-2J		
	G	7414-2J		
H01J 49/10		4230-5E		

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平 4 - 2 4 9 5 3 1
(22) 出願日 平成 4 年 (1992) 9 月 1 8 日

(71) 出願人 0 0 0 0 0 5 1 0 8
株式会社日立製作所
東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地
(72) 発明者 松村 和美
茨城県勝田市市毛 8 8 2 番地 株式会社日立製作所計測器事業部内
(72) 発明者 三村 忠男
茨城県勝田市市毛 8 8 2 番地 株式会社日立製作所計測器事業部内
(72) 発明者 加藤 義昭
茨城県勝田市市毛 8 8 2 番地 株式会社日立製作所計測器事業部内
(74) 代理人 弁理士 小川 勝男

(54) 【発明の名称】 液体クロマトグラフ直結質量分析計

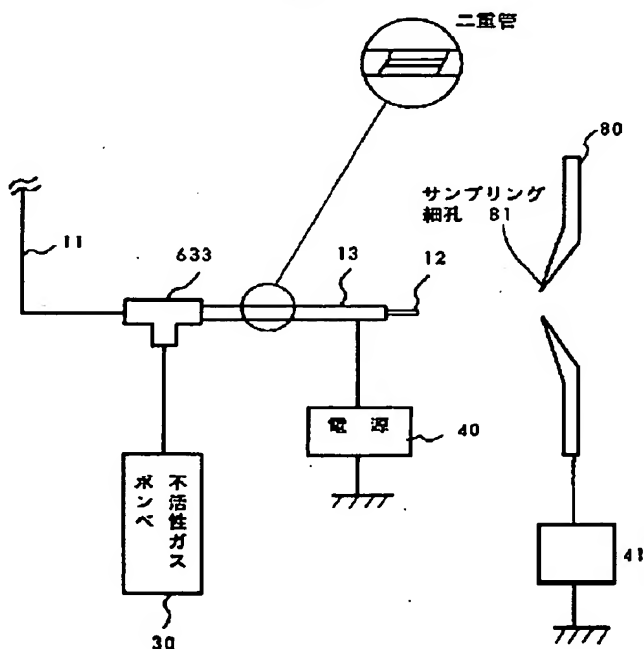
(57) 【要約】

【目的】 混合物試料の各成分のイオン化を促進し、かつ、より確実な同定を可能とすること。

【構成】 溶出した成分を分割し正、負両イオン化極性で交互、または一定時間ずつに分析する。分析時には、各イオン化促進溶媒を導入し感度の向上を行う構造をとる。

【効果】 本発明により試料の軽減および分析時間の短縮が可能となる。さらに試料によっては両極性でイオン化するためより詳しい分子量情報を得ることができる。

図 3



1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】正イオン検出、負イオン検出モードを交互もしくはプログラミングにより制御できる液体クロマトグラフ直結質量分析計において、イオン化のモードに同期して、正イオン化モードでは正イオン、負イオン化モードでは負イオンの生成を促進するイオン化促進剤をカラム分離後の溶出液に添加する手段を備えたことを特徴とする液体クロマトグラフ直結質量分析計。

【請求項 2】請求項 1 において、紫外検出器等の手段によって成分の溶出を確認し、その成分溶出によるピークに対応する部分の前半部と後半部を分割し、各々を最適イオン化促進剤を加えた、正、負極性イオン化モードにより、イオン化することを特徴とする液体クロマトグラフ直結質量分析計。

【請求項 3】請求項 1 又は 2 において、正イオン化モードと負イオン化モードに対する各イオン化促進剤が、互いに混合しないことを特徴とする液体クロマトグラフ直結質量分析計。

【請求項 4】請求項 3 において、正イオン化用、負イオン化用のプローブを各 1 個ずつ以上備えたことを特徴とする液体クロマトグラフ直結質量分析計。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は液体クロマトグラフ直結質量分析計（以下 LC/MC と略す）に関し、特に混合物分離分析において、各成分を一回の測定において正、負両イオン化モード下で分子量情報の取得と高効率のイオン化を可能にするイオン源の機構に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来液体クロマトグラフと質量分析計を結合することは困難であった。最近の LC の発達により、LC で分けられた試料の同定を質量分析する要望が高まり、いくつかの LC/MS のイオン源が開発された。これらのイオン源はいずれのものにおいても、イオン化できる試料の範囲が限られており、万能なものはない。しばしば LC で分析される高極性物質の中の一部の物質や、イオン性物質である蛋白質はエレクトロスプレー法（以下 ESI と略す）やイオンスプレー法が開発され MS による分析が可能となった。図 3 に ESI 法の概略を示す。以下図に従って説明する。カラムから溶出した成分は配管 11 を通りイオン源部に達する。配管 11 はティ 633 に結合している。溶出液は内管 12 に導入される。またティ 633 の一端には不活性ガスのボンベ 30 が結合している。ここからガスが内管 12 と外管 13 の間に導入される。二重管 12、13 には電源 40 から高電圧が印加される。内管 12 とサンプリング細孔 81 を中心に持つ対向電極 80 の間には電源 40 から供給される高電圧が印加され、高電界が生成している。そのため内管 12 の先端に達した試料溶液は高電界にさらさ

2

れる。この高電界によって液滴の表面には内管 12 に印加した電圧の極性と同極性のイオンが局在する。液滴は内管 12 の先端からサンプリング細孔 81 に移動しながら溶媒の蒸発により微細化される。同極性のイオン電荷による反発力が表面張力を上回ると液滴は更に微細化する。さらに内管 12 と外管 13 の間に導入されたガスの力により、液滴の微細化は促進される。最終的に試料のイオンが溶液から気体中に放出される。イオンはサンプリング細孔 81 から質量分析部に導入され、質量分散を受けマススペクトルを与える。

【0003】ESI 法は、蛋白質やペプチド等の高極性、イオン性物質をたやすくイオン化し、多価イオンを生じる特徴を持つ。そのため限られた質量範囲で分子量 1 万以上の蛋白質の正確な分子量情報も与えることができる。正イオン化測定モードにおいて塩基性アミノ酸残基を多く含む蛋白質を酢酸等の酸を溶媒として分析を行うと、アミノ基にプロトンが付加しやすくなり、多価イオンを容易に生成する。すなわち移動相に酸を用いると正電荷を帯びる塩基性アミノ酸残基の数が多くなり、その結果多価イオンを容易に生成することができる。現時点での蛋白質、ペプチドの混合物を液体クロマトグラフィーによって分離し、質量分析を行った報告では、移動相に酸-有機溶媒系を使用している。試料を酸性溶液に溶解したときに生じる電荷の数が、純水に溶解した場合よりも多くなるため、塩基性蛋白質を、酸性移動相で分離することは有用な手段と考えられる。一方酸性蛋白質において移動相が酸性溶液の場合、あるいは酸性溶液に溶解した場合、酸性アミノ酸残基のカルボキシル基の解離がおさえられ、一方アミノ基にプロトンが付加する。結果としてイオン化および質量分析が可能となることもある。しかし塩基性アミノ酸の数が酸性アミノ酸の数に比べ極端に少ない試料の場合、イオン化が行われても質量分析計の質量範囲を超えた多価イオンのみが生成し、その結果質量分析が不可能となる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】現時点では、ペプチド、蛋白質の混合物の質量分析を行うには酸性移動相を使用し有機溶媒でグラジエント溶出を行うことが一般的である。測定すべき混合物試料の成分すべてが塩基性アミノ酸残基が酸性アミノ酸残基より多い、いわゆる塩基性ペプチドや塩基性蛋白質である場合、正イオンモードを使用すると、各成分は容易にイオン化される。しかし成分の中で、酸性アミノ酸が塩基性アミノ酸よりはるかに多いものや、塩基性アミノ酸のアミノ基の多くがスルホン基で修飾されているものがある場合では、そのペプチドは中性溶液中で全体としては負に帯電している。そのためイオン化は正イオンモードで行うより、負イオンモードで行う方が効率良いと考えられる。ESI では負イオンモードでの測定も可能である。負イオンモードイオン化に際し、溶液中のプロトンを減少させるために、

PHを高くするか負イオン生成を促進する試薬等の添加が必要である。しかし混合物試料の分離手段であるカラムのうちシリカ系のカラムの一部は塩基性条件下での使用が不可能である。仮に混合物成分の全てが酸性蛋白質や酸性ペプチド（これらは負イオンモードでイオン化しやすい）の場合、分離後の成分にイオン化を促進する試薬を添加すれば負イオンモードで高感度測定が可能となる。しかし含まれる成分のうち、正イオンモードでイオン化しやすい成分（塩基性ペプチド等）ではイオン化効率の低下が起こる。従来はESI測定（通常数分から60分程度）を開始すれば、いずれか一方のイオンモードで行う。また測定中に走査（Scan）毎に正負のモードを切り換えながら測定すると両イオン化極性でイオン化をおこなえとえられる。しかし電気的な極性の切り換え及び走査の切り換えは数秒で行うことができるが、溶液の切り換えは通常少なくとも数分以上の時間を要する。ここで一回の測定中、各成分を分割し、一方を正イオン生成促進剤を添加し正イオンモードで検出し、他方を負イオン生成促進剤を添加し負イオンモードで検出することができれば、全ての成分について両イオンモードでの測定が可能となる。さらに各試料成分に関して、いずれの極性が感度の高いモードであるかを知ることができる。しかし別種類のイオン化促進剤を一箇所でも同じ配管に導入すると、短時間で配管系を完全に洗浄することは不可能である。さらに短時間で移動相の種類の切り換えを行うと各イオン化促進溶媒の混合を招き、結果としてイオン化促進が不可能になる。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記問題点を解決するにはイオン源およびその配置、配管系の改良が必要である。本発明では試料の溶出もしくはプログラミングによって、イオン源に印加する電圧の極性を正もしくは負に切り換える。イオン化促進剤添加方法について以下図2を用いて説明する。導入された溶出液は管1を通る。この管1は三方ジョイント631、632を貫通し、中管2の内部に端を有している。ポンプ22からはイオン化促進剤を送液する。三方ジョイント631と632の間では、イオン化促進剤は内管1と外管2の間に導入される。中管2は三方ジョイント63に一端を有し、三方ジョイント632を貫通し、外管3の内部を貫通し、大気中に他端を有している。図2では外管3の先端部に近い側は二重管となっている。溶出液と促進剤の混合は内管1が中管2の内部で端となった部分から、中間2の内部で行われる。三方ジョイント632からの内管1の長さが10mmとし、また中管2の長さが45mmとすると混合部は35mmの部分となる。内管1は拡散を防ぐためキャピラリーを使用する。その内径と外径は各々0.05mm、0.3mmである。中管2の内径は内管1の外径より大きくある必要があり、0.4mmである。外径は0.6mmである。また補助ガスはポンプ30から三方ジョイント6

32に導入され中管2と外管3の間に導入される。ガスの温度はイオン化を最適にするために温度制御されている。ガスは外管3の先端より放出され、中管2から溶出した液滴の微細化を促進する。ここでイオン化促進剤は、正イオンモードでは酢酸やメタノールを添加するようにする。負イオンモードではアンモニア等の負イオン化促進剤を添加するようにする。混合の方法として、ボストカラムで、三方ジョイントを用いて行うことも可能である。しかしESIでの許容流量は0.01ml/min程度と低く、そのため特殊な三方ジョイントが必要となる。

【0006】別発明として溶出した成分を分割する場合、測定開始時から正負のイオン化を交互に行う方法がある。この方法はイオン化促進剤には正、負別種類のを添加するため切り換えが難しい。より確実にイオン化の極性に適したイオン化促進剤を添加する方法として、溶出した成分をUV検出器等70で確認し、そのピークを二等分割し各々を別種類のイオン化促進剤の添加によってイオン化することがえられる。分割は三方弁によって行う。正負両イオン化促進剤が混合しない手段について、以下図1の本発明の構成図を使用し説明する。試料混合液はインジェクタ51から導入される。各成分はカラム52によって分離された後検出器70に導入される。インターフェイス部は正イオン生成促進用61と負イオン生成促進用62があり、並列に接続される。紫外吸収光度計70等で試料の溶出及びバックグラウンドが制御装置90に伝えられる。ここから信号が三方バルブ53に送られ溶出成分を2つに分割する。例えば溶出成分の後半が負イオン化促進用のインターフェイスに導入されるものとする。通常三方弁は正イオン化促進用に接続される。電源40、41から供給される印加電圧の極性も正である。制御装置90には常に検出器70から信号が送られている。この時すでに制御装置90はS/Nレベルの判定を行っている。S/Nが5以上になるとその時点でこの部分をピークとして判定する。制御装置90は信号の微分係数が0となる時をピークトップと判定し、その時点で三方弁53の負イオン化促進用イオン源への切り換え、及び電源40、41の印加電圧の切り換え、負イオン化促進溶媒を添加するポンプ222の作動、正イオン化促進溶媒を添加するポンプ221の停止を行う。三方弁53から試料全てが内管2（図2）の先端に達する、すなわち試料全てがイオン化されるまでの時間は、配管の内径と長さといオン源に導入される流量によって算出され、これらの値は予め制御装置90に登録される。この時間が経過すると制御装置90から三方ジョイント53及び電源40、41に信号が送られ流路、極性の切り換えが行われ、同様に正イオン生成を行う。UV検出器70からの配管はキャピラリー等を用い、拡散、混合を防ぐ必要がある。また電界を乱すことがないよう、インターフェイスには同時には同極性の電圧が

印加される。溶出成分は成分を前後に分割する方法もあるが、質量分析計の走査毎に三方弁を切り替え検出を行い、正、負モードを切り替えることも可能である。

【0007】また別の発明を示す。先述のイオン源を備えることが本発明の特徴であるが、試料によっては、イオン化極性が同極性であってもイオン化促進剤が異なる場合がある。この様な場合には溶出成分を三等分、あるいは三分割（不等分割も可）以上にし、異なったイオン化促進剤でイオン化を行い分析することができる。この時三方弁ではなく、試料の分割数に相当する弁を使用することが必要となる。この場合も制御装置 90 から指令が送られる。

【0008】

【作用】図 1 を用い本発明の作用について示す。混合物試料はインジェクタ 51 から導入され、カラム 52 によって各成分に分離される。分離された成分は UV 検出器 70 などの検出手段によってその溶出を確認される。この溶出は制御装置 90 に信号として伝えられる。この信号を受け、制御装置 90 から三方弁 53 に成分を分割するための信号が送られる。成分は正イオン化促進イオン源部 61 と負イオン化促進イオン源部 62 とに分割導入される。さらに制御装置 90 から電源 40、41 にポンプ 21 と結合している側のイオン化促進イオン源部のイオン化モードに合わせた極性の電圧が印加される。ここで一方のイオン化モードでのイオン化が行われる。続いて制御装置 90 により弁の切り換えが行われ同様に逆のイオン化モードでのイオン化が行われる。イオン化促進剤を添加することにより各イオン化モードでの感度の向上を計ることができる。さらに正負イオン化促進イオン源を各々設けることによって各イオン化促進剤の混合を防ぐことができる。

【0009】

【実施例】図 1、図 4、図 5 を用い本発明の一実施例を示す。図 1 は本発明の構成図である。混合物試料の分離に使用される移動相は LC ポンプ 21 から送られる。混合物試料はインジェクタ 51 から導入される。混合物はカラム 52 に導入され各成分に分離される。分離された成分は UV 検出器 70 等でその溶出を確認された後正イオン化促進剤を添加されるイオン源 61 部と負イオン化促進剤を添加されるイオン源 62 部へ三方バルブ、あるいは三方ジョイント等の分岐手段によって分割される。その分割は制御装置 90 から送られる信号によって行われる。分割はいかなる様式でもよいが、すばやくかつデッドボリュームが生じないように行う必要がある。溶出試料をその溶出時間で前半部と後半部に分けた場合、一方を正イオン化促進剤を導入するイオン源に、また他方を負イオン化促進剤を導入するイオン源に導入する。分割導入は弁によって行う。弁の作動は制御装置 90 によって行う。その導入に同調して電源からイオン化プローブ全体に正、または負の高電圧を印加する。イオン化促

進剤を送液するポンプもイオン化極性に同調して作動することが好ましいが、これに限らない。試料の溶出する時間の長さによって弁の切換えを試料溶液の前後、あるいは質量分析計の走査に同調して交互に行う。これは予め決めておくことが可能である。さらにプログラミングして行ってもよい。

【0010】イオン源部 61 には LC ポンプ 221 が接続され、正イオン生成促進剤である酢酸水やギ酸水が供給される。またイオン源部 62 にも同様 LC ポンプ 222 が接続され負イオン生成促進剤であるアンモニア水やイソプロパノール等が供給される。これらのポンプの ON、OFF も制御装置 90 によって制御される。ここでは試料にトリプシン消化を行った Vasoactive Intestinal Peptide (VIP と略す) を使用した例を示す。VIP のアミノ酸配列を図 5 に示す。トリプシンは塩基性アミノ酸であるリジン (K と略す)、アルギニン (R と略す) の C 末端側 (カルボキシル末端) を特異的に切断する酵素である。また塩基性アミノ酸が 2 残基以上重なった部分は切断を受けにくい。ため、K、R の断片を考えないとこのペプチドは 4 つの断片に分けられる。各断片を N 末端側から順に VIP-T1、VIP-T2、VIP-T3、VIP-T4 とする。生じた酵素消化物を逆相系のカラムで分離を行う。移動相は 0.1% ギ酸水溶液を使用し、0.1% ギ酸をふくむアセトニトリル溶液でグラジエント溶出を行う。分配によって分離が行われるため、溶出する順序は VIP-T2、VIP-T3、VIP-T4、VIP-T1 の順である。このうち VIP-T1 には酸性アミノ酸残基であるアスパラギン酸 (D と略す) が 2 残基含まれている。酸性条件下で正電荷を持ちうる箇所は両端のヒスチジン (H と略す) と R である。これらのアミノ酸残基も中性 PH では電荷が帯びにくい。さらに塩基性条件下では D と C 末端が負の電荷を帯びる。H の等電点は PH 7.59 であり、R の等電点は PH 10.76 である。そのため PH 7 以下では R、H とともに正電荷を帯びた状態であるが PH 8、PH 9 では R のみが正に帯電する。さらに PH が高くなり PH 11 以上になると R、H のアミノ基の解離はおさえられる。一方 D の等電点は PH 2.77 である。D に関しては PH 3 以上で負電荷を帯びた状態で存在する。従って VIP-T1 では、PH 11 以上になると R、H のプロトン付加は起こらず D のカルボキシル基のプロトンが放出された、いわゆる負電荷のみの存在が予想される。ここでペプチド全体は負電荷を帯びる。他の蛋白質やペプチドにおいて、トリプシンで消化した生成物は塩基性アミノ酸残基で切断を受けるため、塩基性アミノ酸の残基数が、酸性アミノ酸の残基数をはるかに下回る場合には、その断片は負イオン測定モードにて測定を行う方が、電荷の価数が増えるため限られた質量範囲で測定を行う上で有用である。また正、負両イオン化モードを同時に使用することにより酸性物質、塩基性物質の混合物の同時測定

が可能となる。図 4 は UV 検出器で溶出を確認したクロマトグラム、及びその時のイオン源に印加する電圧を示したものである。電圧はピークの前半部を負に後半を正の極性にしてプローブ全体に印加した。ここでは三方弁を用いているが、弁を用いないで試料を二方向に同時に流し（三方ジョイント等を用いて）、イオン化極性を交互に変えることもできる。イオン化極性を交互に変える方法で測定した VIP のトリプシン消化物のデータを図 5 に示す。ここでは正イオン化モードでのみの測定以上に詳しいイオン化情報が得られることがわかる。

【 0 0 1 1 】 さらに別の発明として、弁を成分の分割数に合わせ、またイオン化プローブの数も使用するイオン化促進剤の種類に合わせて設置する。ここでは多くのイオン化促進剤を使用することができる上、イオン化促進剤同志の混合を防ぐことが可能となる。

【 0 0 1 2 】 これらの発明により成分を一回の測定で正、負両極性でイオン化し測定を行うことができる。そのため測定試料の量を軽減することが可能となる。さらに測定時間を短縮することも可能となる。また酸性成分、塩基性成分が混合した試料においても、各成分の適したイオン化極性モード（正、負）での分子量情報を得ることができる。またイオン化促進剤を添加することで酸性試料においても試料によっては正イオン化モードでイオン化し得ることもあり、逆に塩基性成分でも負イオン化モードでイオン化するものもある。これらの試料においては両極性での擬分子イオンピーク、あるいは物質由来の分子量情報を示すイオンピークを得ることができる。つまり両イオン化モードでイオン化が可能な試料については、より正確な分子量情報、構造情報を得ること

が可能となる。

【 0 0 1 3 】

【発明の効果】 本発明により、混合物試料を同一測定で異なったイオン化極性でイオン化し測定することができ。さらに各極性でのイオン化を促進するため、酸性、塩基性物質の混合物を同時に高感度測定することが可能となる。測定を一度で両極性下で行うため、試料料の軽減と時間の短縮が可能となる。

【図面の簡単な説明】

10 【図 1】 本発明の構成図である。

【図 2】 本発明の主要構成図である。

【図 3】 エレクトロスプレー法の模式図である。

【図 4】 本発明における UV 検出器でのピークとイオン化極性の関係図である。

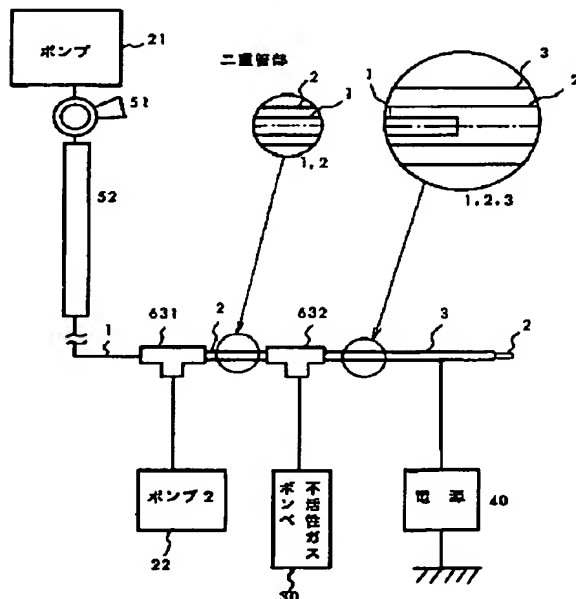
【図 5】 VIP トリプシン消化物の測定例を示す図である。

【符号の説明】

1, 12...内管、2...中間、3, 13...外管、11...送液管、21...液体クロマトグラフポンプ 1、22...液体クロマトグラフポンプ 2、30...不活性ガスポンプ、40...電源（イオン源用高電圧）、41...電源（差動排気電圧用）、51...インジェクタ、52...カラム、53...三方弁、61...正イオン化促進イオン源部、62...負イオン化促進イオン源部、70...検出器、80...対向電極、81...サンプリング細孔、90...制御装置、221...正イオン生成促進剤送液ポンプ、222...負イオン生成促進剤送液ポンプ、631, 632, 633...三方ジョイント（ティ）。

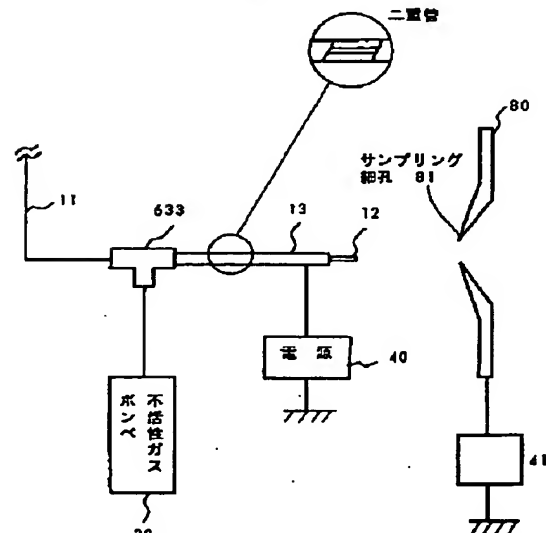
【図 2】

図 2



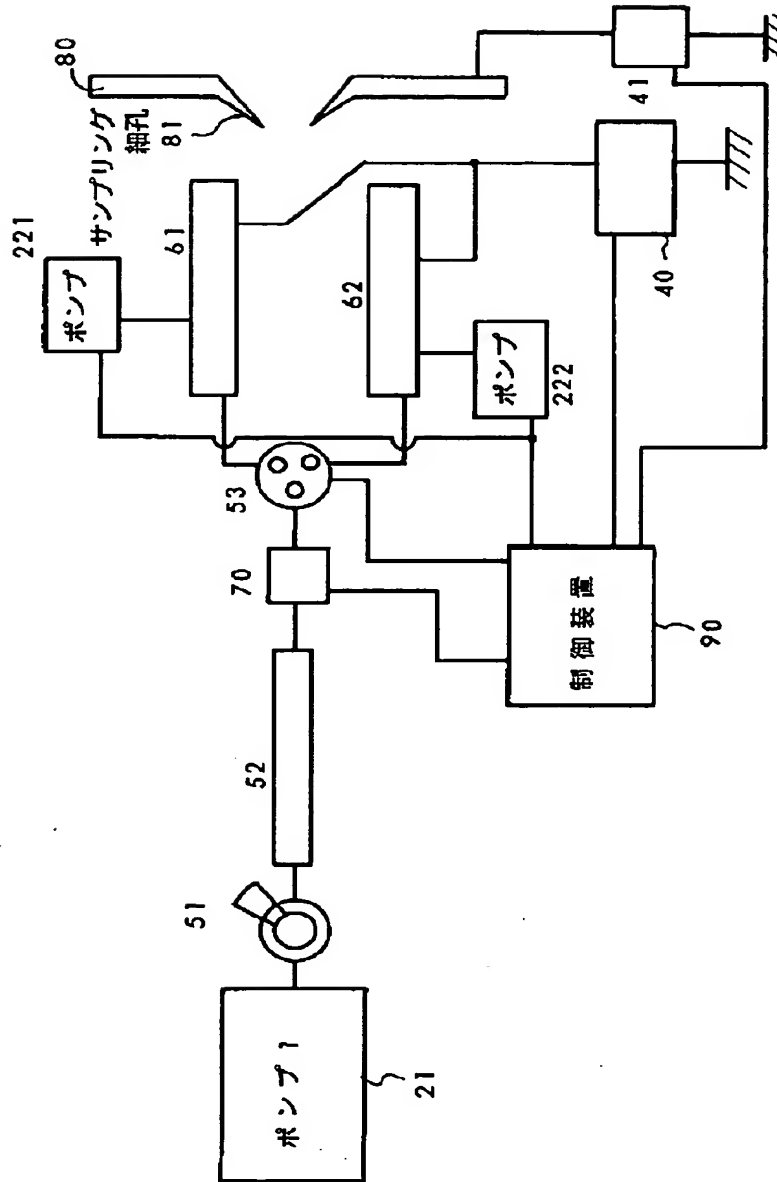
【図 3】

図 3

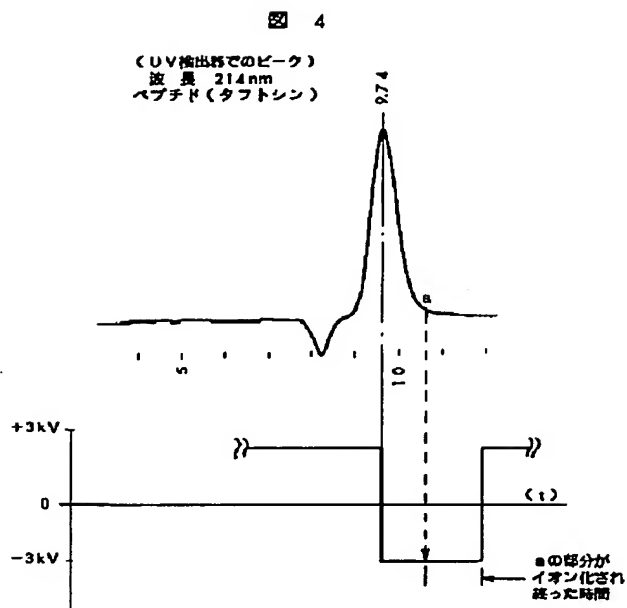


【図 1】

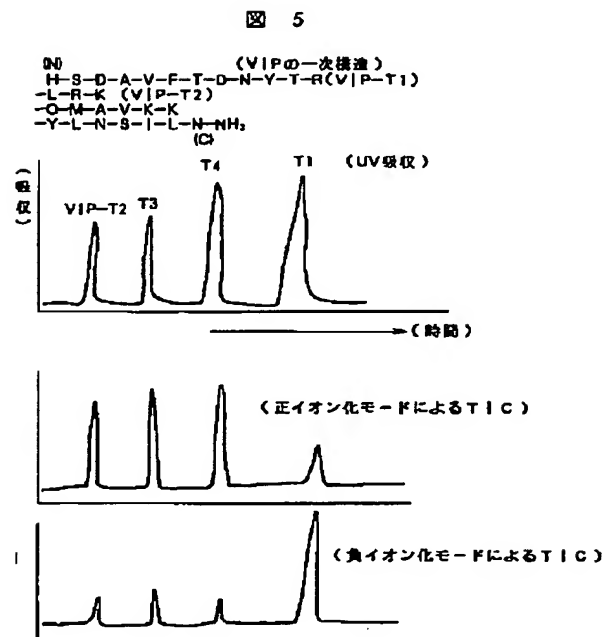
図 1



【図 4】



【図 5】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.